

# 原核 pprI 基因活体转染对 BALB/c 小鼠急性放射损伤保护作用的研究

施怡 文玲 任丽丽 杨占山

**【摘要】** 目的 研究耐辐射奇球菌 pprI 基因活体转染对小鼠急性放射损伤的防护作用。方法 采用 SPF 级纯品系 BALB/c 雄性小鼠,应用活体电转染技术,将 pEGFP-c1 空载质粒及 pEGFP-c1-pprI 基因重组质粒转入小鼠股前肌肉。应用<sup>60</sup>Co  $\gamma$  射线进行全身照射,死亡率观察组吸收剂量为 6 Gy,观察照后 30 d 内小鼠死亡率的变化;放射效应观察组吸收剂量为 4 Gy,于照后 1、7、14、28 和 35 d 观察小鼠外周血象、胸腺、脾脏和骨髓细胞的凋亡率,并于照后第 7 和 28 天观察小鼠肺脏和睾丸组织的病理变化。结果 质粒注射剂量为 50  $\mu$ g/50  $\mu$ l,电场强度为 200 V/cm 时转染肌细胞的效率最高。pEGFP-c1-pprI 基因重组质粒转染组小鼠急性辐射死亡率为 30%,显著低于单纯照射组(60.0%)和空载体组(63.3%)( $\chi^2 = 4.90, 6.24, P < 0.05$ )。与单纯照射组、空载体组比较,pEGFP-c1-pprI 基因重组质粒转染组小鼠的外周血白细胞计数在照后 1、7、14 和 28 d 显著增高( $F = 16.26, 8.10, 6.37, 10.74, P < 0.05$ ),血小板计数在照后第 7 和 14 天显著增高( $F = 7.36, 5.71, P < 0.05$ ),淋巴细胞百分率在照后 7 d 显著增高( $F = 18.43, P < 0.05$ );胸腺和骨髓细胞凋亡率均在照后第 1、7、14、28 和 35 天显著降低( $F = 3.88, 14.91, 14.14, 39.86, 5.65, P < 0.05$ ;  $F = 53.70, 11.75, 21.78, 41.40, 4.54, P < 0.05$ );脾脏细胞凋亡率在照后第 1、7、14 和 28 天显著降低( $F = 97.95, 56.61, 33.55, 14.71, P < 0.05$ )。pEGFP-c1-pprI 基因重组质粒转染组小鼠肺脏和睾丸的放射病理损伤较轻并且恢复较快。结论 耐辐射奇球菌 pprI 基因活体电转染对 BALB/c 小鼠急性放射损伤具有显著的保护作用,为进一步临床应用奠定了实验基础。

**【关键词】** 耐辐射奇球菌; pprI 基因; BALB/c 小鼠; 活体电转染; 急性放射损伤

**Role of prokaryotic pprI gene in protecting BALB/c mice from acute radiation injury** Shi Yi, Wen Ling, Ren Lili, Yang Zhanshan. School of Radiation Medicine and Protection, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China

Corresponding author: Yang Zhanshan, Email: fd@suda.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the radioresistant effects of pprI gene of *Deinococcus radiodurans* on BALB/c mice. **Methods** Male BALB/c mice in SPF level were applied for this work. The pEGFP-c1 plasmid and pEGFP-c1-pprI gene recombinant plasmid were transferred into anterolateral muscle of mice with in vivo electroporation technology. The mice were irradiated by 6 Gy <sup>60</sup>Co  $\gamma$ -rays in whole body and the mortality of mice was observed within 30 days after irradiation. In addition, the mouse were irradiated with 4 Gy  $\gamma$ -rays and then the peripheral blood cell number, apoptosis rates of thymocyte cells, spleen cells and bone marrow cells were observed in the days of 1, 7, 14, 28 and 35 after irradiation while the histopathological changes of lung and testis were observed in the days 7 and 28 after  $\gamma$ -ray irradiation.

**Results** The highest gene transfection efficiency of muscle cells was obtained in a Plasmid injection amount of 50  $\mu$ g/50  $\mu$ l and electric field strength of 200 V/cm. The acute radiation mortality of pEGFP-c1-pprI gene recombinant plasmid transfer group was 30%, lower than that of irradiation group (60.0%) and pEGFP-c1 plasmid transfer group (63.3%) after 6 Gy  $\gamma$ -ray irradiation ( $\chi^2 = 4.90, 6.24, P < 0.05$ ). Compared with the irradiation group and pEGFP-c1 plasmid transfer group, the WBC count of pEGFP-c1-pprI gene recombinant plasmid group in peripheral blood of mice was significantly higher in the days of 1, 7, 14 and 28 ( $F = 16.26, 8.10, 6.37, 10.74, P < 0.05$ ), PLT count was significantly higher in days of 7

and 14 ( $F=7.36, 5.71, P<0.05$ ), meanwhile the lymphocyte percentage was increased significantly on the 7<sup>th</sup> day ( $F=18.43, P<0.05$ ) after irradiation. On the other hand, the apoptosis rates of thymocyte cells and bone marrow cells were significantly decreased in the days of 1, 7, 14, 28 and 35 ( $F=3.88, 14.91, 14.14, 39.86, 5.65, P<0.05$  and  $F=53.70, 11.75, 21.78, 41.40, 4.54, P<0.05$ ) while the apoptosis rate of spleen cells was significantly decreased in the days of 1, 7, 14 and 28 ( $F=97.95, 56.61, 33.55, 14.71, P<0.05$ ) after irradiation. Finally, the radiation histopathological changes of lung and testis of the pEGFP-c1-pprI gene recombinant plasmid group were slight and easy to recover.

**Conclusions** Transfection of pprI gene of *Deinococcus radiodurans* by *in vivo* electroporation has significant protective effect on the acute radiation injury in BALB/c mice, which may have important clinical applications.

**【Key words】** *Deinococcus radiodurans*; pprI gene; BALB/c mice; *In vivo* electroporation; Acute radiation injury

耐辐射奇球菌(*Deinococcus radiodurans*, DR)是目前为止发现的耐辐射能力最强的生物之一<sup>[1-2]</sup>。因其对电离辐射、紫外线等辐射引起的致死和突变效应具有极强的抗性,近年来倍受辐射生物学、医学和环境工程学者的关注<sup>[3-4]</sup>。pprI 基因是耐辐射奇球菌 DNA 损伤修复和保护途径的总开关基因,可通过调控耐辐射奇球菌 recA、pprA 等基因的表达而加速电离辐射引起的 DNA 损伤的修复<sup>[5]</sup>。研究表明,该基因转化大肠杆菌,可以增强大肠杆菌的辐射抗性<sup>[6]</sup>。然而,由于原核生物与真核生物这两大种系在基因、蛋白组成和调控机制存在巨大差异,原核 pprI 基因能否转入 BALB/c 小鼠并在其体内发挥放射防护的作用,迄今尚未见国内外有关文献报道。本实验采用活体电转染技术,将本实验室构建 pEGFP-c1-pprI 基因真核表达载体<sup>[7]</sup>,转染到 BALB/c 小鼠中,采用多种放射生物学指标,研究原核 pprI 基因对高等真核哺乳动物急性辐射损伤的防护作用。

## 材料与方 法

1. 质粒:pEGFP-c1-pprI 真核表达载体由本实验室制备保存。

2. 主要试剂与仪器:质粒大量抽提试剂盒购自德国 QIAGEN 公司,凋亡试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司,活体基因导入仪(ECM830)购自美国 BTX 公司,血液细胞分析仪购自深圳迈瑞公司,流式细胞仪(Cytomics FC500)购自美国 Beckman 公司。

3. 实验动物及分组:SPF 级纯品系 BALB/c 雄性小鼠共 178 只,购自上海斯莱克实验动物公司,6~8 周龄,体重( $18 \pm 2$ )g,经 1 周适应期饲养后,将小鼠用随机数字表法分为质粒转染剂量组(8 只),死亡率观察组(90 只)和放射效应观察组(80 只)。

其中,死亡率观察组 90 只,又分为 3 个组,单纯照射组,转染空载体 pEGFP-c1 的空载体组,转染 pEGFP-c1-pprI 的转基因组,每组 30 只;放射效应观察组又分为对照组(未照射)5 只,单纯照射组、空载体组和转基因组各 25 只。

4. 质粒活体电转染小鼠:不同剂量的无内毒素的 pEGFP-c1-pprI 质粒  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  分别注射小鼠后腿股前肌肉,注射 1 min 后,用 ECM830 型活体基因导入仪,给予不同电场强度刺激。转染后 24 h 处死小鼠,取注射部位的肌肉做冰冻切片,用荧光显微镜观察 GFP 的荧光强度,确定重组质粒 pEGFP-c1-pprI 注射的最佳剂量和最佳电场强度。死亡率观察组和放射效应观察组的空载体组和转基因组分别于照前 24 h 将质粒 pEGFP-c1 和重组质粒 pEGFP-c1-pprI 以最佳剂量( $50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ )注射入小鼠股前肌,1 min 后用 ECM830 型活体基因导入仪以最佳电场强度进行转染。

5. 照射条件:苏州大学<sup>60</sup>Co  $\gamma$  源照射,吸收剂量率为  $0.38 \text{ Gy}/\text{min}$ ,死亡率观察组吸收剂量为 6 Gy,放射效应观察组吸收剂量为 4 Gy。

6. 死亡率观察:单纯照射组、空载体组和转基因组小鼠,经  $\gamma$  射线 6 Gy 照后饲养于无菌室中,观察 30 d,每天记录小鼠的死亡情况。

7. 小鼠外周血象的检测:小鼠经  $\gamma$  射线照射 4 Gy 后,分别于照后 1、7、14、28 和 35 d 小鼠眼球取血,置于含 EDTA 的抗凝管中,用血液细胞分析仪测定 WBC、PLT 和淋巴细胞分类计数。

8. 小鼠胸腺、脾脏淋巴细胞和骨髓细胞凋亡率检测:小鼠经  $\gamma$  射线照射 4 Gy 后,分别于照后 1、7、14、28 和 35 d 小鼠处死,取胸腺和脾脏置于 2 ml PBS 中,梳刮制备淋巴细胞单细胞悬液。取股骨后用 1 ml PBS 冲洗骨髓腔,制备骨髓细胞单细胞悬液。将上述单细胞悬液离心半径 6.5 cm,2 000 r/min,离心 5 min

后用 PBS 洗 1 次,再次同样离心弃上清,加 3 ml Tris-NH<sub>4</sub>Cl 溶液 (pH 7.2) 混匀,静置 5 min,破除红细胞,然后加 PBS 至 10 ml 中止。离心收集细胞 (1~5) × 10<sup>5</sup> 个,加入 500 μl 的 Annexin V 结合液悬浮细胞,再加入 5 μl Annexin V 和 5 μl PI,避光室温孵育 10 min,送流式细胞仪检测。

9. 小鼠组织器官的病理观察:对照组小鼠 3 只,处死后取肺、睾丸;单纯照射组、空载体组和转基因组分别于照射后第 7 和 28 天每组取 5 只小鼠处死,取肺、睾丸制作石蜡病理切片,显微镜下观察病理图片。

10. 统计学处理:数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 SPSS 16.0 统计软件对血象和细胞凋亡数据进行单因素方差分析,对组间实验数据进行 LSD 检验。小鼠生存率分析采用 Log-rank 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 根据小鼠肌肉组织 GFP 绿色荧光强度确定最佳质粒注射剂量和电场强度:质粒注射剂量一定 (50 μg/50 μl) 时,随着电场强度增大,小鼠肌肉组织的 GFP 的荧光强度逐渐增强,于 200 V/cm 时达到最强,之后随着电场强度增大,GFP 的荧光强度反而降低;电场强度一定 (200 V/cm),随着质粒注射剂量的增加,小鼠肌肉组织的 GFP 的荧光强度逐渐增强,于注射剂量为 50 μg 时达到最强,之后增加注射剂量,GFP 的荧光强度反而降低。因此,死亡率观察组和放射效应观察组中的空载体组和转基因组注射剂量定为 50 μg/50 μl,用 ECM830 型活体基因导入仪给予电场强度 200 V/cm,持续 50 ms,频率 1 Hz 的电脉冲 8 个。

2. 小鼠受照后的死亡率:各组小鼠经 6 Gy γ 射线照射后 30 d 内单纯照射组、空载体组、转基因组小鼠死亡率分别为 60.0%、63.3% 和 30.0%。转基因组小鼠的死亡率较单纯照射组和空载体组均降低,差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 4.90, 6.24, P < 0.05$ )。空载体组小鼠死亡率与单纯照射组相比,差异无统计学意义。3 组小鼠的死亡多集中于照射后 15 d 内。

3. 小鼠外周血白细胞计数:4 Gy γ 射线照射后各组小鼠不同时间点外周血白细胞计数的变化见表 1。由表 1 可知,照后 1 d,各组小鼠的外周血白细胞计数均开始降低,并于照后 7 d 降至最低,14 d 开始恢复,至 35 d 恢复正常;在照后 1、7、14 和 28 d,转基因组小鼠外周血白细胞计数明显高于单纯照射组,差异有统计学意义 ( $t = 3.53, 3.34, 1.69, 3.96, P < 0.05$ ),并且明显高于空载体组,差异有统计学意义 ( $t = 4.21, 2.65, 2.37, 2.48, P < 0.05$ );与单纯照射组和空载体组相比,在照后 1、7、14 和 28 d,转基因组小鼠外周血白细胞计数减少,差异有统计学意义 ( $F = 16.26, 8.10, 6.37, 10.74, P < 0.05$ )。

4. 小鼠外周血血小板计数:4 Gy γ 射线照射后小鼠不同时间点外周血血小板计数变化列于表 2。照后 1 d,各组小鼠的外周血血小板计数均出现降低,并于照后 7 d 降至最低,14 d 开始恢复,至 35 d 恢复正常;在照后 7 和 14 d,转基因组小鼠外周血血小板计数明显高于单纯照射组,差异有统计学意义 ( $t = 2.82, 1.86, P < 0.05$ ) 并且明显高于空载体组,差异有统计学意义 ( $t = 2.62, 2.41, P < 0.05$ );与单纯照射组和空载体组相比,转基因组小鼠外周血血小板计数在 7 和 14 d 减少幅度少于另两组,差异有统计学意义 ( $F = 7.36, 5.71, P < 0.05$ )。

表 1 照射后不同时间小鼠外周血白细胞计数的变化 ( $\times 10^9/L, \bar{x} \pm s$ )

组别	只数	1 d	7 d	14 d	28 d	35 d
对照组	5	4.88 ± 0.54	4.88 ± 0.54	4.88 ± 0.54	4.88 ± 0.54	4.88 ± 0.54
单纯照射组	5	1.18 ± 0.34	0.85 ± 0.28	1.92 ± 0.23	3.03 ± 0.41	4.55 ± 0.77
空载体组	5	1.12 ± 0.27	0.81 ± 0.47	1.61 ± 0.32	3.37 ± 0.64	4.60 ± 0.52
转基因组	5	2.09 ± 0.29 <sup>ab</sup>	1.60 ± 0.26 <sup>ab</sup>	2.57 ± 0.64 <sup>ab</sup>	4.35 ± 0.28 <sup>ab</sup>	5.11 ± 0.34

注:<sup>a</sup>与单纯照射组比较, $t = 3.53, 3.34, 1.69, 3.96, P < 0.05$ ; <sup>b</sup>与空载体组比较, $t = 4.21, 2.65, 2.37, 2.48, P < 0.05$

表 2 照后不同时间小鼠外周血血小板计数的变化 ( $\times 10^9/L, \bar{x} \pm s$ )

组别	只数	1 d	7 d	14 d	28 d	35 d
对照组	5	839.60 ± 70.23	839.60 ± 70.23	839.60 ± 70.23	839.60 ± 70.23	839.60 ± 70.23
单纯照射组	5	534.33 ± 71.02	335.40 ± 68.53	408.40 ± 77.77	531.20 ± 85.32	821.77 ± 99.22
空载体组	5	522.25 ± 56.72	368.20 ± 78.57	369.60 ± 77.67	525.40 ± 80.27	837.20 ± 96.19
转基因组	5	545.60 ± 69.47	511.80 ± 84.11 <sup>ab</sup>	543.00 ± 98.37 <sup>ab</sup>	652.00 ± 87.70	867.41 ± 99.92

注:<sup>a</sup>与单纯照射组比较, $t = 2.82, 1.86, P < 0.05$ ; <sup>b</sup>与空载体组比较, $t = 2.62, 2.41, P < 0.05$

5. 小鼠外周血淋巴细胞百分率:4 Gy  $\gamma$  射线照射后不同时间点小鼠外周血淋巴细胞百分率变化见表 3。由表 3 可知,照后 1 d 各组小鼠的外周血淋巴细胞百分率均出现降低,并于照后 7 d 降至最低,14 d 开始恢复,至 35 d 恢复正常;在照后 7 d,转基因组小鼠外周血淋巴细胞百分率明显高于单纯照射组,差异有统计学意义( $t = 3.70, P < 0.05$ ),并且明显高于空载体组,差异有统计学意义( $t = 4.30, P < 0.05$ );与单纯照射组和空载体组相比,转基因组小鼠外周血淋巴细胞百分率在 7 d 减少,差异有统计学意义( $F = 18.43, P < 0.05$ )。

6. 小鼠胸腺细胞凋亡率:4 Gy  $\gamma$  射线照射后不同时间点小鼠胸腺细胞凋亡率的变化见表 4。由表 4 可知,照后 1 d 各组小鼠胸腺细胞凋亡率均出现增高,并于照后 7 d 增高至最高值,14 d 开始恢复,至 35 d 基本恢复正常;在照后 1、7、14、28 和 35 d, pEGFP-c1-pprI 基因转染组小鼠胸腺细胞凋亡率明显低于单纯照射组,差异有统计学意义( $t = 1.89、3.86、5.15、7.15、2.26, P < 0.05$ )并且在照后 7、14、28 和 35 d 明显低于空载体组,差异有统计学意义( $t = 3.73、2.94、4.64、2.75, P < 0.05$ );与单纯照射组和空载体组相比,在照后 1、7、14、28 和 35 d,转基因组小鼠胸腺细胞凋亡率增高幅度少于另两组,差异有统计学意义( $F = 3.88、14.91、14.14、39.86、5.65, P < 0.05$ )。

7. 小鼠脾脏细胞凋亡率:4 Gy  $\gamma$  射线照射后不同时间点小鼠脾脏细胞凋亡率的变化列于表 5。由表 5 可知,照后 1 d 各组小鼠脾脏细胞凋亡率均出现增高,并于照后 7 d 增至最高值,14 d 开始恢复,至 35 d 恢复正常;在照后 1、7、14 和 28 d, pEGFP-c1-pprI 基因转染组小鼠脾脏细胞凋亡率明显低于单纯照射组,差异有统计学意义( $t = 12.50、7.36、7.38、4.19, P < 0.05$ )并且明显低于空载体组,差异有统计学意义( $t = 8.15、8.26、5.42、3.31, P < 0.05$ );与单纯照射组和空载体组相比,转基因组小鼠脾脏细胞凋亡率在照后 1、7、14 和 28 d 虽然也增高,但是增高幅度少于另两组,差异有统计学意义( $F = 97.95、56.61、33.55、14.71, P < 0.05$ )

8. 小鼠骨髓细胞凋亡率:4 Gy  $\gamma$  射线照射后不同时间点小鼠骨髓细胞凋亡率变化列于表 6。由表 6 可知,照后 1 d 各组小鼠骨髓细胞凋亡率均出现增高,并于照后 7 d 增至最高值,14 d 开始恢复,35 d 恢复正常;在照后 1、7、14、28 和 35 d, pEGFP-c1-pprI 基因转染组小鼠骨髓细胞凋亡率明显低于单纯照射组,差异有统计学意义( $t = 11.43、3.06、4.23、7.60、2.01, P < 0.05$ )并且在照后 1、7、14 和 28 d 明显低于空载体组,差异有统计学意义( $t = 5.08、4.00、6.55、5.44, P < 0.05$ );与单纯照射组和空载体组相比,在照后 1、7、14、28 和 35 d,转基因组小鼠骨髓细胞凋亡率增高幅度少于另两组,差异有统计

表 3 照后不同时间小鼠外周血淋巴细胞百分率的变化(%,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	1 d	7 d	14 d	28 d	35 d
对照组	5	72.72 $\pm$ 9.80	72.72 $\pm$ 9.80	72.72 $\pm$ 9.80	72.72 $\pm$ 9.80	72.72 $\pm$ 9.80
单纯照射组	5	50.27 $\pm$ 6.95	27.16 $\pm$ 5.36	55.32 $\pm$ 6.10	67.46 $\pm$ 5.06	72.03 $\pm$ 6.14
空载体组	5	53.55 $\pm$ 5.92	24.68 $\pm$ 5.21	56.04 $\pm$ 6.49	67.80 $\pm$ 4.14	71.97 $\pm$ 7.01
转基因组	5	52.68 $\pm$ 5.06	43.78 $\pm$ 5.65 <sup>ab</sup>	64.02 $\pm$ 4.54	70.88 $\pm$ 9.11	73.57 $\pm$ 7.17

注:<sup>a</sup>与单纯照射组比较, $t = 3.70, P < 0.05$ ;<sup>b</sup>与空载体组比较, $t = 4.30, P < 0.05$

表 4 照后不同时间小鼠胸腺细胞凋亡率的变化(%,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	1 d	7 d	14 d	28 d	35 d
对照组	5	3.07 $\pm$ 1.02	3.07 $\pm$ 1.02	3.07 $\pm$ 1.02	3.07 $\pm$ 1.02	3.07 $\pm$ 1.02
单纯照射组	5	6.28 $\pm$ 1.17	17.51 $\pm$ 2.56	13.00 $\pm$ 1.46	8.93 $\pm$ 0.25	4.33 $\pm$ 0.80
空载体组	5	5.58 $\pm$ 0.84	16.23 $\pm$ 1.95	12.14 $\pm$ 2.87	8.47 $\pm$ 0.91	4.43 $\pm$ 0.70
转基因组	5	4.16 $\pm$ 1.56 <sup>a</sup>	10.70 $\pm$ 1.68 <sup>ab</sup>	6.57 $\pm$ 1.60 <sup>ab</sup>	5.00 $\pm$ 0.92 <sup>ab</sup>	3.20 $\pm$ 0.33 <sup>ab</sup>

注:<sup>a</sup>与单纯照射组比较, $t = 1.89、3.86、5.15、7.15、2.26, P < 0.05$ ;<sup>b</sup>与空载体组比较, $t = 3.73、2.94、4.64、2.75, P < 0.05$

表 5 照后不同时间小鼠脾脏细胞凋亡率的变化(%,  $\bar{x} \pm s$ )

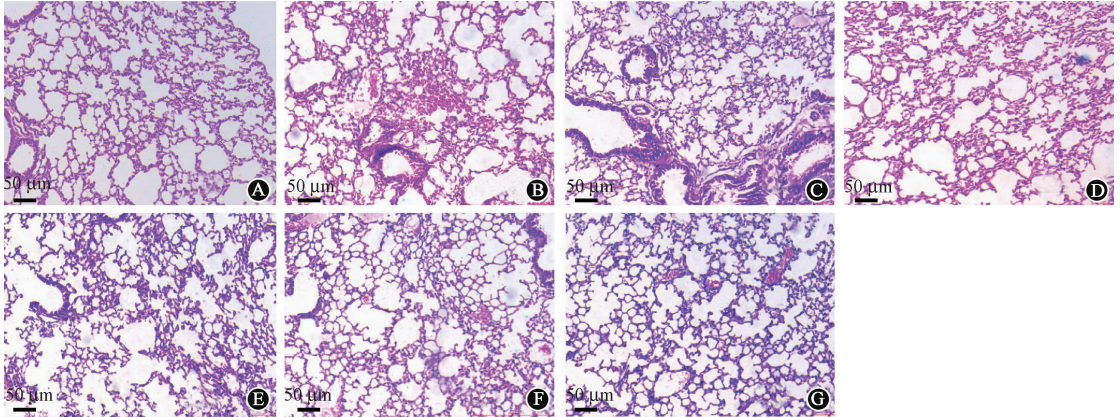
组别	只数	1 d	7 d	14 d	28 d	35 d
对照组	5	3.46 $\pm$ 0.40	3.46 $\pm$ 0.40	3.46 $\pm$ 0.40	3.46 $\pm$ 0.40	3.46 $\pm$ 0.40
单纯照射组	5	12.89 $\pm$ 0.96	17.75 $\pm$ 1.70	12.53 $\pm$ 1.54	8.40 $\pm$ 1.30	4.33 $\pm$ 0.71
空载体组	5	11.55 $\pm$ 1.39	16.96 $\pm$ 1.28	11.89 $\pm$ 1.91	7.83 $\pm$ 1.51	4.20 $\pm$ 0.66
转基因组	5	4.14 $\pm$ 0.74 <sup>ab</sup>	9.70 $\pm$ 0.83 <sup>ab</sup>	5.81 $\pm$ 0.36 <sup>ab</sup>	4.20 $\pm$ 1.15 <sup>ab</sup>	3.67 $\pm$ 0.60

注:<sup>a</sup>与单纯照射组比较, $t = 12.50、7.36、7.38、4.19, P < 0.05$ ;<sup>b</sup>与空载体组比较, $t = 8.15、8.26、5.42、3.31, P < 0.05$

表 6 照后不同时间小鼠骨髓细胞凋亡率的变化( $\%, \bar{x} \pm s$ )

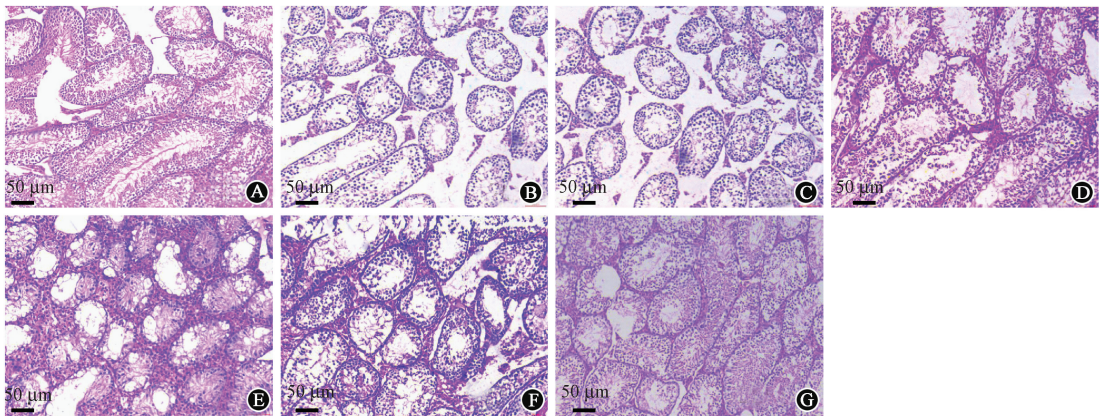
组别	只数	1 d	7 d	14 d	28 d	35 d
对照组	5	5.26 ± 0.98	5.26 ± 0.98	5.26 ± 0.98	5.26 ± 0.98	5.26 ± 0.98
单纯照射组	5	11.86 ± 0.49	16.97 ± 3.38	13.35 ± 2.72	10.07 ± 0.85	6.20 ± 0.85
空载体组	5	10.67 ± 1.07	17.05 ± 2.30	13.23 ± 1.65	9.53 ± 1.20	5.40 ± 0.57
转基因组	5	7.19 ± 0.51 <sup>ab</sup>	10.04 ± 1.99 <sup>ab</sup>	6.51 ± 0.66 <sup>ab</sup>	5.06 ± 0.76 <sup>ab</sup>	4.30 ± 1.40 <sup>a</sup>

注: <sup>a</sup>与单纯照射组比较,  $t = 11.43, 3.06, 4.23, 7.60, 2.01, P < 0.05$ ; <sup>b</sup>与空载体转染组比较,  $t = 5.08, 4.00, 6.55, 5.44, P < 0.05$



注: A 为正常小鼠肺脏组织切片, B ~ D 分别为照后 7 d 单纯照射组、空载体组、转基因组小鼠肺脏组织切片, E ~ G 分别为照后 28 d 单纯照射组、空载体组、转基因组小鼠肺脏组织切片

图 1 小鼠肺脏组织病理切片图 HE × 100



注: A 为正常小鼠睾丸组织切片, B ~ D 分别为照后 7 d 单纯照射组、空载体组、转基因组小鼠睾丸组织切片, E ~ G 分别为照后 28 d 单纯照射组、空载体组、转基因组小鼠睾丸组织切片

图 2 小鼠睾丸组织病理切片图 HE × 100

学意义 ( $F = 53.70, 11.75, 21.78, 41.40, 4.54, P < 0.05$ )。

9. 小鼠肺脏的病理变化: 各组小鼠照射后 7 和 28 d 肺脏的组织学变化见图 1。单纯照射组小鼠照射后 7 d, 肺泡壁血管充血严重, 红细胞渗出较多, 肺泡间隔水肿严重; 空载体组小鼠照射后 7 d, 红细胞渗出增多, 充血增多, 肺泡腔出现水肿液。转基因组小鼠照射后 7 d, 肺泡毛细血管壁充血较单纯照射组、空载体组轻, 有红细胞渗出, 肺泡腔轻度水肿。单纯照射组、空载体组小鼠照射后 28 d, 红细胞渗出

减少, 肺泡间隔水肿, 上皮增生变厚, 肺泡受压变形。pEGFP-c1-pprI 基因转染组小鼠照射后 28 d, 红细胞渗出减少, 肺泡间隔轻微增厚, 组织结构基本恢复正常。

10. 小鼠睾丸的病理变化: 各组小鼠照后 7 和 28 d 的睾丸组织学变化示于图 2。由图 2 可见, 照后 7 d 单纯照射组、空载体组睾丸破坏严重, 生精小管及支持细胞萎缩坏死, 精原细胞及各级精母细胞变性坏死, 数量减少, 中间腔空虚, 管腔内出现胶原物质, 转基因组变化较轻; 照后 28 d 时, 单纯照射组

和空载体转染组“空白区”增多,而转基因组小鼠的部分生精小管及支持细胞再生完成,各级精原细胞排列整齐紧密。

## 讨 论

电离辐射在给人类经济和生活带来巨大裨益的同时,各种核与辐射事故亦不断发生,其大剂量电离辐射会引起广阔地域和人群的急性放射损伤(acute radiation injury, ARI)。近年来,为了应对核突发事件,提高国家核安全水平,急性放射损伤救治与防护的研究已成为世界各国重点投资和研究的领域,迄今有关文献报道极少。耐辐射奇球菌发现 50 余年来,耐辐射奇球菌 pprI 基因及其蛋白的功能及抗辐射机制的研究多局限于原核细胞内,即耐辐射奇球菌自身或大肠杆菌系统<sup>[5-7]</sup>。本实验室近年来研究表明,耐辐射奇球菌 pprI 基因转染对 BALB/c 小鼠中子急性放射损伤具有显著的防护作用<sup>[8-9]</sup>。本实验在此基础上,观察带有荧光标记的耐辐射奇球菌 pprI 基因对辐射敏感的 SPF 级 BALB/c 小鼠的辐射防护作用,结合造血免疫系统的变化,重要脏器病理的变化,进一步阐明耐辐射奇球菌 pprI 基因对哺乳动物的抗辐射作用。

活体基因电转染通过直流电场的瞬间作用将外源目的基因导入活体的靶组织或器官。该方法被认为是一种可行性较高的高效转染方法,已经被应用于很多组织和动物模型<sup>[10-11]</sup>。pprI 基因是耐辐射奇球菌 DNA 损伤修复的关键基因,本研究证实,转染了 pEGFP-c1-pprI 的稳转细胞株辐射抗性增强,细胞 DNA 损伤修复加快<sup>[7]</sup>。高剂量电离辐射可以导致严重的 ARI,进而引起多器官的损伤和死亡率增高。BALB/c 小鼠对辐射相当敏感,本实验发现 pprI 基因转染组小鼠的死亡率明显低于单纯照射组及空载体转染组,表明 pprI 基因成功转染到小鼠体内后对小鼠起到了辐射防护作用,降低了受照小鼠的死亡率。

电离辐射所致的造血系统的变化可作为 ARI 诊治及预后的重要判断指标<sup>[12]</sup>。本实验检测了不同组别小鼠受照后不同时间点白细胞、血小板、淋巴细胞百分率及胸腺、脾脏、骨髓细胞凋亡率的变化。结果显示小鼠白细胞、血小板及淋巴细胞百分率在照后均降低,胸腺、脾脏、骨髓细胞的凋亡率均增高,但 pprI 基因转染组小鼠的血象降低程度及细胞凋亡增高程度均低于单纯照射组和空载体组。

表明 pprI 基因可以提高机体的防御能力,通过胸腺、脾脏、骨髓细胞的凋亡来调节免疫及造血系统,加快放射损伤的修复。

ARI 常表现为多系统的损伤,除了造血功能抑制,放射性肺损伤、生殖系统损伤等都是常见的病理变化。实验结果显示,小鼠在受 4 Gy  $\gamma$  射线照射后,肺脏血管通透性增高、肺泡充血水肿、肺泡腔出现水肿液,而 pprI 基因转染组小鼠肺脏的病变轻于单纯照射组和空载体组,且恢复较快,表明 pprI 基因对肺脏有明显的保护作用,可以减少肺脏充血、水肿,减轻肺纤维化,促进修复。睾丸对射线高度敏感,受照后睾丸生精小管及支持细胞萎缩坏死,精原细胞及各级精母细胞变性坏死,数量减少,中间腔空虚,而 pprI 基因转染组小鼠病变较轻,至 28 d 部分生精小管及支持细胞再生完成,各级精原细胞排列整齐紧密,组织结构基本恢复正常,表明 pprI 基因可以保护睾丸组织,加速修复。

综上所述,pprI 基因转染可以提高小鼠受照后的生存率,并且可能通过加强造血系统、免疫系统及其他重要脏器的修复能力来提高整个机体的辐射抗性。本研究为原核 pprI 基因的进一步临床应用提供了有价值的资料。

## 参 考 文 献

- [1] Battista JR, Eral AM, Park MJ. Why is *Deinococcus radiodurans* so resistant to ionizing radiation [J]. Trends Microbiol, 1999, 7(9):362-365.
- [2] Minton KW. DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*[J]. Mol Microbiol, 1994, 13(1): 9-15.
- [3] Brim H, McFarlan SC, Fredrickson JK, et al. Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments[J]. Nat Biotechnol, 2000, 18(1): 85-90.
- [4] Lange CC, Wackett LP, Mintonation KW, et al. Engineering a recombinant *Deinococcus radiodurans* for organopollutant degradation in radioactive mixed waste environment [J]. Nat Biotechnol, 1998, 16(10):929-933.
- [5] Hua Y, Narumi I, Gao G, et al. PprI: a general switch responsible for extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 306(2): 354-360.
- [6] Gao G, Tian B, Liu L, et al. Expression of *Deinococcus radiodurans* PprI enhances the radioresistance of *Escherichia coli* [J]. DNA Repair, 2003, 2(12): 1419-1427.
- [7] 文玲,施怡,任丽丽,等.耐辐射球菌 pprI 基因真核表达载体的构建及其抗辐射作用[J].中华放射医学与防护杂志, 2014, 34(8):563-568.

综上所述,本研究认为 ASCs 能减轻受照射骨骼肌的病理组织学损伤,促进肌卫星细胞的代偿增生、再生肌组织,可能是修复骨骼肌放射损伤的部分机制。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies[J]. *Tissue Eng*, 2001,7(2):211-228.
- [ 2 ] Akita S, Akino K, Hirano A, et al. Noncultured autologous adipose-derived stem cells therapy for chronic radiation injury [J]. *Stem Cells Int*, 2010,2010(12):1-8.
- [ 3 ] Akita S, Akino K, Hirano A, et al. Mesenchymal stem cell therapy for cutaneous radiation syndrome [J]. *Health Phys*, 2010,98(6):858-862.
- [ 4 ] Ebrahimian TG, Pouzoulet F, Squiban C, et al. Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009,29(4):503-510.
- [ 5 ] Hadad I, Johnstone BH, Brabham JG, et al. Development of a porcine delayed wound-healing model and its use in testing a novel cell-based therapy [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2010,78(3):888-896.
- [ 6 ] Agay D, Scherthan H, Forcheron F, et al. Multipotent mesenchymal stem cell grafting to treat cutaneous radiation syndrome: Development of a new minipig model [J]. *Exp Hematol*, 2010,38(10):945-956.
- [ 7 ] 孙威,倪新初,孙苏平.高剂量照射兔骨骼肌放射损伤的超微病理研究[J].*中华放射医学与防护杂志*, 2012,32(6):593-596.
- [ 8 ] Gallet P, Phulpin B, Merlin JL, et al. Long-term alterations of cytokines and growth factors expression in irradiated tissues and

relation with histological severity scoring[J]. *PLoS One*, 2011, 6(12):e29399.

- [ 9 ] Ghosh PS, Milone M. Clinical and laboratory findings of 21 patients with radiation-induced myopathy [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2015,86(2):152-158.
- [ 10 ] Nakagami H, Maeda K, Morishita R, et al. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005,25(12):2542-2547.
- [ 11 ] Dicker A, Le Blanc K, Aström G, et al. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue [J]. *Exp Cell Res*, 2005,308(2):283-290.
- [ 12 ] Schmalbruch H, Lewis DM. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles [J]. *Muscle Nerve*, 2000,23(4):617-626.
- [ 13 ] Walsh S, Nygren J, Pontén A, et al. Myogenic reprogramming of bone marrow derived cells in a W(4)(1)Dmd(mdx) deficient mouse model[J]. *PLoS One*, 2011,6(11):e27500.
- [ 14 ] Nygren JM, Liuba K, Breitbach M, et al. Myeloid and lymphoid contribution to non-haematopoietic lineages through irradiation-induced heterotypic cell fusion [J]. *Nat Cell Biol*, 2008,10(5):584-592.
- [ 15 ] LaBarge MA, Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury [J]. *Cell*, 2002,111(4):589-601.
- [ 16 ] Misao Y, Takemura G, Arai M, et al. Bone marrow-derived myocyte-like cells and regulation of repair-related cytokines after bone marrow cell transplantation[J]. *Cardiovasc Res*, 2006,69(2):476-490.

(收稿日期:2015-03-18)

(上接第 490 页)

- [ 8 ] 杨占山,李娜,王天昶.一种含有原核基因 pprI 的真核重组质粒及其用途[P].中国,ZL200910003512.2.2011-04-06.
- [ 9 ] 陈婷婷,连利霞,牟英,等.抗辐射球菌 pprI 基因活体电转染救治小鼠  $\gamma$  射线损伤的实验研究[J].*辐射研究与辐射工艺学报*,2010,28(3):166-171.
- [ 10 ] Wang Q, Jiang W, Chen Y, et al. *In vivo* electroporation of minicircle DNA as a novel method of vaccine delivery to enhance HIV-1-specific immune responses[J]. *J Virol*, 2014, 88(4):1924-1934.

- [ 11 ] Bodles-Brakhop AM, Heller R, Draghia-Akli R. Electroporation for the delivery of DNA-based vaccines and immunotherapeutics: current clinical developments [J]. *Mol Ther*, 2009,17(4):585-592.
- [ 12 ] Shao L, Feng W, Li H, et al. Total body irradiation causes long-term mouse BM injury via induction of HSC premature senescence in an lnk4a- and Arf-independent manner [J]. *Blood*, 2014,123(20):3105-3115.

(收稿日期:2014-12-24)